



①9 **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENTAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 41 19 203 A 1**

⑤1 Int. Cl.<sup>5</sup>:  
**C 07 K 15/06**  
C 07 K 15/28  
C 07 K 3/20  
B 01 D 15/08

⑳ Aktenzeichen: P 41 19 203 6  
㉑ Anmeldetag: 11. 6. 91  
㉒ Offenlegungstag: 13. 2. 92

**DE 41 19 203 A 1**

③0 Unionspriorität: ③2 ③3 ③1

07.08.90 US 564019

⑦1 Anmelder:

Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Calif., US

⑦4 Vertreter:

Manitz, G., Dipl.-Phys., Dr. rer. nat.; Finsterwald, M.,  
Dipl.-Ing., Dipl.-Wirtsch.-Ing., 8000 München;  
Rotermund, H., Dipl.-Phys., 7000 Stuttgart; Heyn, H.,  
Dipl.-Chem., Dr. rer. nat., Pat.-Anwälte, 8000 München

⑦2 Erfinder:

Cummings, Larry J., Pleasant Hill, Calif., US; Taylor,  
Michael A., Encinitas, Calif., US

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Chromatographieeinsatz

⑤7 Ein chromatographisches Verfahren und ein Apparat zum Reinigen von Protein im allgemeinen und insbesondere von monoklonalen Antikörpern aus Aszitesfluids erzielt gegenüber anderen Verfahren bessere Ergebnisse. Das Verfahren beinhaltet, daß eine Lösung, die die zu reinigenden Proteine enthält, mit einer porösen im wesentlichen nicht quellbaren Bahn in Anwesenheit eines pH-Puffers in Kontakt gebracht wird, die hydratisierte kristalline Hydroxylapatitteilchen physikalisch immobilisiert enthält und daß die gereinigten Proteinfractionen dann eluiert werden, so daß die Fließrate und der Druck sich während des Verfahrens nicht signifikant ändern. Ein bevorzugter Apparat enthält Einlaß- und Auslaßdichtungen, spiralgewickeltes oder um einen Kern gewickeltes chromatographisches Trennmittel, das hydratisierte, kristalline Hydroxylapatitteilchen enthält, die in einer porösen, im wesentlichen nicht quellbaren Bahn physikalisch immobilisiert sind, und eine poröse, zentrale Stütze, um die die Bahn gewickelt ist. Ein anderer Apparat enthält ein einzelnes oder geschichtetes chromatographisches Trennmittel, das hydratisierte, kristalline, in einer porösen, im wesentlichen nicht quellbaren Bahn physikalisch immobilisierte Hydroxylapatitteilchen enthält.

**DE 41 19 203 A 1**

## Beschreibung

Diese Erfindung betrifft allgemein Verfahren zur Trennung von biologischen Materialien. Speziell betrifft diese Erfindung ein chromatographisches Verfahren und eine Vorrichtung zum Reinigen großer Mengen Antikörper auf schnelle und wirksame Art.

In der Technik zum Reinigen komplexer Proteine, wie z. B. polyklonaler und monoklonaler Antikörper, ist es das Ziel gewesen, leicht und schnell gereinigte Antikörperlösungen zu erhalten. In einer sehr allgemeinen Beschreibung kann man ein Verfahren zum Reinigen dieser Substanzen von Aszitesfluid als ein dreistufiges chromatographisches Verfahren charakterisieren. Die erste Stufe kann das Aufbringen des Aszitesfluids auf eine Adsorptionschromatographiesäule sein, in die Hydroxylapatit (HA)-Teilchen gefüllt sind. Dieses Material, das ähnlich und identisch sein kann mit dem Komplexsalz aus dem Knochen besteht, hat eine spezielle Fähigkeit, Proteine zu adsorbieren, während es andere biologische und nicht biologische Moleküle hindurch passieren läßt. Diese Stufe trennt komplexe und einfache Proteine von Lipiden, Fetten, Salzen, Nukleotiden und Polysacchariden.

Die zweite Stufe kann darin bestehen, die Antikörpermoleküle, wie z. B. die IgG, durch ein Ionenaustauschverfahren weiter zu reinigen. Ionenaustauschchromatographie macht sich die Ladungen auf den Proteinen zunutze, um sie an die Kügelchen eines geladenen Trägermediums, wie z. B. an Sephadexteilchen gebundenes DEAE oder QAE, zu binden. In der Anionenaustauschchromatographie werden Proteine bei einem basischen pH, wie z. B. 8,6, aufgebracht, bei dem sie entweder negativ geladen sind (Albumin, Alpha-1-, Alpha-2- und Betaglobuline, wie Transferrin, sind Anionen) oder keine Gesamtladung haben (Gammaglobuline, auch als Immunoglobuline bezeichnet). Die neutralen Proteine passieren sofort durch eine Anionenaustauschsäulenmatrix. Indem man Puffer mit einer höheren Salzkonzentration durchlaufen läßt, verdrängen die Anionen des Salzes das Trägermedium und ermöglichen den Proteinen, aus der Säule zu eluieren. Durch Verwendung eines ständig ansteigenden Gradienten der Salzkonzentration in dem eluierenden Puffer können die komplexen Proteine sogar weiter entsprechend der Ladung gereinigt werden. Eine weitere Reinigung ist jedoch häufig notwendig.

Wenn das interessierende Protein eine spezifische Bindungsneigung, wie z. B. ein Immunoglobulin für ein Antigen, hat, kann eine dritte Stufe die Affinitätschromatographie sein. Diese ist ein sehr wirksames Werkzeug von allen Immunoglobulinen in einer Probe nur die einen spezifischen zu selektieren, die sich an das Antigen binden, das an das Trägermedium kovalent gebunden ist. Nach Auswaschen aller Proteine, die nicht haften bleiben, wird das Material mit hoher Affinität mit einer sehr hohen Salzkonzentration oder einem chemischen Denaturierungsmittel, wie etwa Harnstoff, eluiert.

Immunoglobuline können auch adsorbiert werden, indem man an Sepharose gekuppeltes Staphylokokken-Protein A verwendet wird. Zum Beispiel offenbart die US-PS 47 04 366 (erteilt an Juarez-Salinas und Ott, übertragen auf Bio-Rad Laboratories, Inc. Richmond, California) eine ungewöhnlich starke Bindung von IgG an Protein A, die durch Inkontaktbringen dieser Komponenten in Anwesenheit eines hohen Salzkonzentration enthaltenden Mediums erreicht wurde. Die Patentinhaber geben an, daß eine besonders geeignete Anwendung die Reinigung von monoklonalen Antikörpern von Aszites-

fluid durch Affinitätschromatographie ist. Auf diese Weise können spezifische Abschnitte der Unterklassen von Immunoglobulinen hergestellt werden, wie z. B. IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2A</sub> und IgG<sub>2B</sub>. Dieses Verfahren ist auch als "hydrophobic interaction chromatography" bekannt.

Wie oben angegeben, zielte der Stand der Technik auf Verbesserungen bezüglich Geschwindigkeit und Leichtigkeit der Reinigung und/oder Konzentrierung von monoklonalen Antikörpern. Automatisierte Verfahren wurden entwickelt unter Verwendung der neuesten Software und Hardware Technologie. In der ersten Stufe, der Trennung der Proteine von anderem biologischem und nicht biologischem Material, wurden Fortschritte bei der Verringerung des Drucks, der benötigt wird, um größere Mengen von Probenlösungen durch die mit HA gefüllten Säulen zu treiben. Bukovsky und Kennett (Hybridoma, Vol. 6, No. 2, 1987) beschreiben ein Verfahren zur einfachen und schnellen Reinigung von monoklonalen Antikörpern aus den überstehenden Flüssigkeiten von Zellkulturen und Aszitesfluids durch HA Adsorptionschromatographie im analytischen und präparativen Maßstab. Sie offenbaren eher die Verwendung von hoch fließfähigem Bio-Gel® HT (Bio-Rad) als von dem feinen pulverförmigen HA von DNA-Qualität. Von dem HA von DNA-Qualität wird behauptet, daß es zu geringe Fließraten ergibt, um zur Verarbeitung von großen Probenvolumen geeignet zu sein. Eine Kombination der stufenweisen und linearen Gradienten-Phosphatelutionen ergibt eine wesentlich erhöhte Reinheit der monoklonalen Antikörper.

Vom Verfahren von Bukovsky und Kennett wird gesagt, daß es zwei Vorteile gegenüber anderen HA Adsorptionschromatographiesystemen hat. Erstens wird von dem Verfahren gesagt, daß es eine Trennung mit einem niedrigen Druck (back pressure) erreicht, wobei es nur eine peristaltische Pumpe auf einer Säule im präparativen Maßstab erfordert mit einer Fließrate von 2 bis 3 Milliliter pro Minute. Drücke von 2,76 bis 4,14 bar (40 bis 60 psi) bei einer Rate von 0,5 bis 0,8 Milliliter pro Minute bei Kolonnen im analytischen Maßstab werden auch offenbart. Zweitens verwendet das Verfahren relativ hohe Fließraten, so daß 500 Milliliter des Zellkulturfluids in acht Stunden gereinigt werden können. Bukovsky und Kennett offenbaren eine 30-fache monoklonale Antikörperkonzentration unter Verwendung einer Phosphatgradientenelution gefolgt von einer stufenweisen Phosphatkonzentration-Elution.

Obwohl die Verfahren von Bukovsky und Kennett tatsächlich beeindruckend sind, sind noch höhere Fließraten und niedrigere Drücke wünschenswert. Es wäre besonders erwünscht, wenn höhere Fließraten und niedrigere Drücke ohne Entwicklung von neuen mobilen Phasen erreicht werden könnten. Weiterhin ist es wünschenswert, für Chromatographiesäulen feste stationäre Träger zu haben, die viele Male wiederverwendet werden können und im wesentlichen dieselbe Fließ- und Druckcharakteristik beibehalten. Konventionelle Säulenfüllung von HA ermöglicht frisch gefüllten Bio-Gel® HT Säulen anfangs eine hohe Fließrate bei niedrigen Drücken, aber nach sechs oder sieben Läufen muß die Säulenfüllung von dem Chromatographen ersetzt werden, da die Fließrate wesentlich abnimmt mit einem gleichzeitigen Anstieg des Druckabfalls. Dies ist in der Natur des Hydroxylapatits selbst begründet; die hydratisierte Form hat die Formel  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Wenn die kristallinen Teilchen in konventioneller Säulenfüllungsanordnung hydratisiert werden, expandieren sie leicht.

In konventionell gefüllten Säulen verursacht dies ein

Aneinanderreiben benachbarter Teilchen. Wenn die hydratisierten kristallinen Teilchen einer typischen Phosphatpufferlösung ausgesetzt werden, verursacht das Phosphation eine Verdichtung des HA Bettes. Diese Expansion und Verdichtung sind schädlich für das Bett, da sie ein Verstopfen durch feinste Teilchen (Abrieb) verursachen. Dies hat üblicherweise das Entfernen des alten HA Säuleneinsatzes und das Ersetzen durch einen neuen Einsatz zur Folge, was Zeit kostet, indem zeitweise ein Einsatz außer Betrieb genommen wird.

Ein bis jetzt entwickeltes Verfahren, um ein ähnliches Problem des Verstopfens in der Ionenaustauschchromatographie zu lösen, ist die Verwendung von "Volumenausgleichfritten" in den Einsätzen. Diese Technik wird in der US-PS 48 71 463 (erteilt an Taylor und Rogler-Brown, übertragen auf Sepratech, Carlsbad, Kalifornien) beschrieben. Die Patentinhaber beschreiben die Verwendung von Volumenausgleichfritten, die sich ausdehnen und zusammenziehen, wenn die eingefüllten Ionenaustauschharzteilchen das Volumen ändern, wenn sie Lösungen unterschiedlicher pH-Werte und Ionenstärke ausgesetzt werden. Das Patent beansprucht auch die Verwendung eines Stromverteilers, der den Strom über den gesamten Querschnitt der festen stationären Phase verteilt, und eines Stromsammlers, der den Strom über den gesamten Querschnitt der festen stationären Phase sammelt.

Verbundbahnen sind entwickelt worden, die aus verschiedenen Materialien einschließlich Polytetrafluorethylen (PTFE) hergestellt sind, in die verschiedene teilchenförmige Stoffe permanent eingelagert sind. Zum Beispiel beschreiben die Erfinder in der US-PS 44 60 642 (erteilt an Errede et al. übertragen auf Minnesota Mining and Manufacturing Company, St. Paul, Minnesota) wasserquellbare Verbundbahnen, die Fibrillen aus PTFE enthalten, in die aus Partikeln bestehende Stoffe, wie z. B. Bio-Rad Kationenaustauscherharze, dauerhaft eingelagert sind. Die Patentinhaber offenbaren, daß diese Verbundbahnen für die Gasphasen- oder Flüssigphasenchromatographie geeignet sind wegen ihrer porösen Natur und der sehr gleichmäßigen Verteilung des Substrates, was die "Kanalbildung" verhindert, jedoch nicht den spiralförmigen Fluß zwischen den Membranen verhindert, wenn die Räume zwischen den Membranen nicht zu klein sind. Die adsorbierenden Teilchen sind durchgehend in die PTFE Fibrillen eingelagert, so daß im wesentlichen alle Teilchen in den Fibrillen enthalten sind und nicht im feuchten oder trockenen Zustand abrutschen. PTFE ist an der Oberfläche der Verbundbahnen anwesend. Die adsorbierenden Teilchen sind nicht an der Oberfläche des Komposits, sondern sind stark eingelagert in den zarten PTFE Fibrillen. Es besteht daher kaum eine Chance, daß der teilchenförmige Stoff abrutscht. Die fibrillierte PTFE Oberfläche wird nicht durch andere Materialien haftend gemacht, da angegeben wird, daß sie nicht adsorbierend und nicht benetzt sei als Folge ihrer ungewöhnlich niedrigen Oberflächenspannung trotz der Tatsache, daß die Komposits dieser Materialien sehr hydrophil sein können. Die Patentinhaber offenbaren nicht die Verwendung von HA. Die Patentinhaber offenbaren jedoch, daß in stark wasserquellbaren Verbundbahnen die Verbundbahnen steifer und weniger flexibel als diejenigen sind, die weniger quellen. Sie schlagen die Zugabe von bis zu 70 Gew.-%, bezogen auf den teilchenförmigen Stoff, eines nicht oder leicht wasserquellbaren teilchenförmigen Stoffs vor, um den Komposits eine größere Flexibilität und Weichheit zu verleihen unter Beibehaltung der

guten Festigkeit. Beispiele von offenbarten "Verdünnungsteilchen" sind Kaolin, Talk, Siliciumdioxid, Bentonit und Vermikulit. Die Patentinhaber beschreiben diese "Verdünnungsmittel" als inert, die keine Wirkung auf eine chromatographische Trennung haben.

In der Technik zur Herstellung von Verbundbahnen werden Glas-, Polymer- und Cellulosefaser/Siliciumdioxid Verbundbahnen unter Verwendung der Technologie der Papierherstellung produziert. Diese faserförmigen Papiere werden bei üblichen Filtrieranwendungen eingesetzt. Ahlstrom Filtration, Inc., Mt. Holly Springs, Pennsylvania, produziert solche Verbundbahnen nach in der Technik bekannten Verfahren. Die Verbundbahnen können aus einigen Arten von inerten Fasern und adsorbierenden Teilchen bis 98 Prozent Retention gemacht werden. Verbundbahnen können zwischen 40 und 90 Gewichtsprozent adsorbierende Teilchen enthalten unter Beibehaltung einer guten Trockenfestigkeit. Die Naßfestigkeit ist schlecht, wenn nicht Bindemittel zu der Verbundbahn zugegeben werden. HA ist nicht in Verbundbahnen als adsorbierende Teilchen verwendet worden.

Bei der Suche nach Verfahren zum Erreichen eines gleichmäßigen Fließens quer durch Säulen von präparativer Größe sind Verbundbahnen in einer spiralgewickelten Form verwendet worden (US-PS 47 43 373 von Rai et al.). Dieses Patent beschreibt eine "quellbare Matrix in Bahnform" mit "Abstandsmitteln zwischen jeder Schicht" der spiralgewickelten Bahnen, um ein gesteuertes Quellen der quellbaren Matrix zu ermöglichen. Dies kann als eine Variation in der Struktur der "Volumenausgleichsfritten" des späteren, oben beschriebenen Taylor/Rogler-Brown erteilten Patents eingeordnet werden. Rai et al. geben für ihre feste stationäre Phase an, daß sie eine gleichmäßige Verteilung des Probenflusses schafft ohne ein Ansteigen des Druckabfalls verglichen mit einer stationären Phase, die keine Abstandshalter verwendet.

Bis jetzt ist kein System entwickelt worden zur schnellen Trennung von Proteinen von Aszitesfluids ohne die Verwendung von Volumenausgleichsfritten oder Abstandsmitteln zwischen porösen, im wesentlichen nicht quellbaren, spiralgewickelten oder um einen Kern gewickelten, oder einzelnen oder mehrfach geschichteten chromatographischen Medien und ohne Änderung der Fließrate oder des Druckabfalls, unter Verwendung der HA Adsorptionstechniken.

Es ist nun gefunden worden, daß eine Trennung der Proteine von anderen Molekülen mit hoher, konstanter Kapazität mittels HA Adsorptionschromatographie erreicht werden kann, wenn kristalline HA Teilchen verwendet werden, die permanent in einer porösen, im wesentlichen nicht quellbaren Bahn eingelagert sind, ohne die Verwendung von oder mit nur etwas Volumenausgleich. Der hier verwendete Begriff "im wesentlichen nicht quellbare Bahn" bedeutet, daß die Bahnen im trockenen Zustand wirksam dicht gepackt sind in den hier verwendeten Einsätzen und dann leicht quellen, um sich den inneren Konturen des Einsatzes anzupassen. Die Bahnen können sich dann leicht zurück verdichten auf ihren ursprünglichen trockenen, wirksam gepackten Zustand, wenn sie mit den hierin beschriebenen Pufferlösungen in Kontakt gebracht werden.

Ein Vorteil dieser Anordnung ist die große Erniedrigung des Druckes, der erforderlich ist, um die Proben durch den Einsatz zu drücken. Typischerweise wird nur eine Spritze benötigt. Ein anderer Vorteil ist, daß anders als die sechs oder sieben Läufe je Einsatz, wie bei den

konventionell mit einem Bett gefüllten Säulen möglich sind, die Verwendung der in einem Material, wie z. B. Polytetrafluorethylen (PTFE) oder Glasfasern, dauerhaft eingelagerten HA Teilchen zigfache Läufe je Einsatz erlaubt. Auch erlauben die nicht benetzbaren Oberflächeneigenschaften von PTFE, daß die ganze Oberfläche einer Verbundbahn dem in eine chromatographische Einrichtung hereinkommenden Probenfluß ausgesetzt ist, wodurch die FlieBKapazität bis zu einem Punkt erhöht wird, bei dem Liter einer Probe in einem Bruchteil der Zeit der mit einem konventionell HA-Bett gefüllten Säulen verarbeitet werden können. Und vielleicht am wichtigsten ist, daß die poröse, im wesentlichen nicht quellbaren Bahn die HA Teilchen in einer solchen Weise hydratisieren und dehydratisieren läßt, daß kein Abrieb erzeugt wird, und daß der Oberflächenbereich der Teilchen für den Kontakt mit der hereinkommenden, die monoklonalen und polyklonalen Antikörper enthaltenden Probe konstant gehalten wird.

Weitere Verbesserungen, Vorteile, Ausführungsformen und Gesichtspunkte der Erfindung werden aus der folgenden Beschreibung ersichtlich.

**Fig. 1** ist ein partieller Schnitt eines Seitenrisses einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen chromatographischen Einsatzes;

**Fig. 2** ist eine vergrößerte Querschnittsansicht entlang der Linie 2-2 in **Fig. 1**;

**Fig. 3** ist eine auseinander gezogene perspektivische Ansicht aller Teile des in **Fig. 1** gezeigten chromatographischen Einsatzes;

**Fig. 4** ist eine vergrößerte Querschnittsansicht entlang der Linie 4-4 in **Fig. 1**;

**Fig. 5** ist ein partieller Schnitt eines Seitenrisses einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen chromatographischen Einsatzes;

**Fig. 6** ist eine auseinander gezogene perspektivische Ansicht aller Teile des in **Fig. 5** gezeigten chromatographischen Einsatzes;

**Fig. 7** ist eine Ansicht der Stromverteilungs- oder des Stromsammelgitters, das auf die inneren Flächen des in **Fig. 5** und **Fig. 6** gezeigten chromatographischen Einsatzes eingedrückt ist;

**Fig. 8** ist ein in Beispiel 1 erhaltenes Chromatogramm;

**Fig. 9** ist ein in Beispiel 2 erhaltenes Chromatogramm;

**Fig. 10** ist ein in Beispiel 3 erhaltenes Chromatogramm.

Die folgenden Definitionen werden zum vollständigen Verständnis der Erfindung gegeben und, wenn jeder unten beschriebene Begriff hier verwendet wird, ist die im folgenden gegebene Bedeutung gemeint:

"Protein(e)" — biologische Moleküle, die eine fortlaufende Kette von Kohlenstoff- und Stickstoffatomen aufweisen, die durch Peptidbindungen zwischen benachbarten Aminosäuren miteinander verbunden sind, und alle primären, sekundären, tertiären und quaternären Strukturen dieser Moleküle;

"Einfache Proteine" — Proteine, die keine nichtproteinische prosthetische Gruppe einschließen, zum Beispiel Albumin und Transferrin;

"Komplexe Proteine" — antikörperähnliche Protein-konjugate, in denen wenigstens zwei Proteine unter Bildung eines biologisch aktiven Komplexes verbunden sind; ebenso Proteine, die eine nichtproteinische prosthetische Gruppe einschließen, die Coenzyme, wie z. B. Flavine und Pyridinnukleotide, ebenso wie Lipide und Polysaccharide umfassen können;

"Antikörper" — wie er hier verwendet wird, soll dieser Begriff spezielle Gammaglobuline (in der Regel) oder Betaglobuline (gelegentlich) umfassen, die in einem lebenden Körper gegen und als Ergebnis der Stimulierung durch spezifische Antigene gebildet wurden. Der Begriff soll "schwere" und "leichte" Ketten von Antikörpern, Fragmente solcher Ketten und Komplexe zwischen Kettenfragmenten, Ketten und Antikörpern einschließen — er schließt IgM, IgA, IgG, IgD und IgE von Immunglobulinen ein und alle Allotypen und Idiotypen von, aber nicht darauf eingeschränkt, Mensch-, Mäuse-, Ziegen-, Rinder- oder Kaninchenspezies;

"Chromatographischer Apparat" und "chromatographische Vorrichtung" — jeder Apparat oder jede Zusammensetzung von Einzelementen (einschließlich herkömmliche chromatographische Säulen), der bzw. die Moleküle auf Grund unterschiedlicher physikalischer, chemischer oder struktureller Eigenschaften trennt;

"Chromatographisches Medium" und "chromatographisches Trennmittel" — wie er hier verwendet wird, bedeutet dieser Begriff das tatsächliche chromatographisch aktive Element in einem chromatographischen Apparat oder einer chromatographischen Vorrichtung, d. h. das Element, das die Aufteilung der Moleküle auf Grund der unterschiedlichen physikalischen, chemischen oder strukturellen Eigenschaften bewirkt;

"pH-Puffer" — eine Flüssigkeit, die den pH des chromatographischen Trennmittels oder des chromatographischen Mediums "im Gleichgewicht hält";

"Hydratisierte kristalline Hydroxylapatitteilchen" — Hydroxylapatit, der in seiner im wesentlichen kristallinen Form vorliegt, der zu jedem möglichen Grad der Hydratation hydratisiert ist und eine Teilchengröße im Bereich von etwa 1 bis etwa 300 Mikrometern hat;

"Feste stationäre Phase" — ein chromatographisches Medium, durch das eine mobile Phase läuft;

"Dauerhaft eingeschlossen", "dauerhaft eingelagert" und "dauerhaft immobilisiert" — wie sie hier verwendet werden, beziehen sich diese Begriffe auf Teilchen, die ihre physikalische Form und Größe, nicht aber ihre räumliche Lage innerhalb einer porösen, im wesentlichen nicht quellbaren Bahn ändern können, wodurch ein wesentliches Rutschen der Teilchen und die Bildung von Abrieb als Folge des Aneinanderreibens verhindert wird, und die physikalisch und/oder chemisch innerhalb der Bahn gehalten werden;

"Poröse, im wesentlichen nicht quellbare Bahn" — wie er hier verwendet wird, bezieht sich dieser Begriff auf eine Materialbahn mit einer Dicke in Bereich von etwa 0,0127 bis etwa 0,635 cm (0,005 bis 0,25 inch), die eine Porengröße im Bereich von etwa 0,2 bis etwa 15 Mikrometern haben;

"Monoklonale Antikörper" — wie er hier verwendet wird, bezieht sich dieser Begriff auf hoch spezifische Antikörper, die durch klonierte Zellen einer einzigen Hybrid-Zelle, dem Fusionsprodukt einer Antikörper produzierenden Lymphocyten-Zelle und einer immortalen, malignen Lymphocyten-Zelle, Beispiele sind IgM, IgG Monoklonale, gebildet wurden;

"Phosphatgradient" — dieser Begriff bezieht sich auf Eluierungsverfahren, bei denen die Konzentration der Phosphationen graduell erniedrigt oder erhöht wird, um gebundenes Protein von den Hydroxylapatitteilchen zu eluieren.

Es wird nun auf die Zeichnung Bezug genommen. Die in **Fig. 1** gezeigte Ansicht zeigt viele der Einzelteile des Chromatographieeinsatzes einer Ausführungsform in

zusammengebauter Form. Drücke von 6,89 bar (100 psi) oder weniger und 3,445 bar (50 psi) oder weniger sind für alle Ausführungsformen bevorzugt. Die Höhe des Druckes wird wesentlich niedriger als etwa 1,72 bar (25 psi), um einen Einsatz mit konstanter Kapazität in der bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform aufrecht zu erhalten. Der zusammengebaute Chromatographieeinsatz 25 umfaßt eine Einlaßdüse 1, eine Auslaßdüse 2, einen ringförmigen Behälter 3, einen Stromverteiler 5, eine Einlaßdichtung 10 und eine Auslaßdichtung 15. Die Ausführungsform des in Fig. 1 gezeigten zusammengebauten Chromatographiesäuleneinsatzes weist ferner eine ringförmige Volumenausgleichsfritte 30, eine zentrale Stütze oder eine zylindrische Volumenausgleichsfritte 40, eine spiralgewickelte oder um einen Kern gewickelte, poröse, im wesentlichen nicht quellbare Bahn 60 auf, die dauerhaft eingelagerte hydratisierte, kristalline Hydroxylapatitteilchen 62 enthält. Fig. 1 zeigt auch den Einlaßstrom 20, der durch die Einlaßdüse 1 und den Stromverteiler 5 läuft unter Bildung einer Vielzahl von den zu reinigenden Antikörper enthaltenden Lösungsströme. Die Einlaßdichtung 10 hindert die einfließende Probe 20 daran, die Säule 25 direkt durch die zentrale Stütze 40 zu passieren. Die Einlaßdichtung 10 in Zusammenarbeit mit dem Stromverteiler 5 zwingt den Fluß zur ringförmigen Volumenausgleichsfritte 30.

In der bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform ist die ringförmige Volumenausgleichsfritte 30 durch mehr spiralgewickelte oder um einen Kern gewickelte, poröse, nichtquellbare Verbundbahn 60 und eine dünne Schicht einer starren porösen Fritte oder Gitters ersetzt. In beiden Anordnungen kommt die einfließende Probe, nachdem sie den Stromverteiler 5 passiert hat und in die ringförmige Fritte 30 kommt, mit der äußersten Fläche 61 der spiralgewickelten oder um einen Kern gewickelten Bahn 60 in Kontakt und bedeckt diese Fläche vollständig. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die Bahn selbst einen geringen Differenzdruck zwischen ihren Flächen hat. Nachdem das Probenfluid mit der äußersten Fläche 61 der spiralgewickelten oder um einen Kern gewickelten Bahn 60 in Kontakt kommt, fließt es durch die Schichten der Bahn 60 in einer Kombination von axialen und radial nach innen gerichteten Strömen, bis es die poröse zentrale Stütze 40 erreicht, auf die die Bahn 60 gewickelt ist. Die Bahn 60 kann nach in der Technik gut bekannten Verfahren an der porösen zentralen Stütze 40 befestigt sein, obwohl dies nicht erforderlich ist. Die poröse zentrale Stütze 40 kann aus jedem porösen Material hergestellt sein, das bezüglich der Probe und den zu verwendenden Elutionsfluids inert ist. Vorzugsweise ist die Stütze 40 poröses Polypropylen in der bevorzugten Ausführungsform, bei der kein ringförmiger Volumenausgleich verwendet werden muß; alternativ kann die poröse zentrale Stütze 40 aus Zellulosefiltermaterial hergestellt sein. In beiden Fällen dient die Stütze 40 als ein rudimentäres Volumenausgleichsmittel. Das Probenfluid fließt dann von der porösen zentralen Stütze zur und durch die Auslaßdüse 2. Die Auslaßdüse 2 hat eine ihr zugehörige Außen-Luer-Verschlußverbindung 7 in der bevorzugten Ausführungsform, in diesem Fall einen Außen-Luer-Verschluß mit Gewinde 8.

Fig. 2 ist eine vergrößerte Querschnittsansicht einer Ausführungsform entlang der Linie 2-2 von Fig. 1. Der Chromatographieeinsatz 25 ist gezeigt mit einem ringförmigen Behälter 3, einer ringförmigen Volumenausgleichsfritte 30, die durch mehr spiralgewickelte oder um einen Kern gewickelte Bahnen 60 in der bevorzug-

ten Ausführungsform ersetzt ist. Ebenfalls gezeigt in Fig. 2 ist die poröse zentrale Stütze 40.

Die poröse, im wesentlichen nicht quellbare, spiralgewickelte oder um einen Kern gewickelte Bahn 60 ist mit hydratisierten kristallinen Hydroxylapatitteilchen 62, die in ihr dauerhaft eingelagert sind, gezeigt. Die Größe der Hydroxylapatitteilchen ist nicht kritisch und kann im Bereich von etwa 1 bis etwa 300 Mikrometern liegen. Bevorzugt ist jedoch ein Hydroxylapatit von DNA-Qualität, der eine durchschnittliche Teilchengröße im Bereich von etwa 48 bis etwa 52 Mikrometern und eine Teilchengrößenverteilung im Bereich von etwa 15 bis etwa 60 Mikrometern hat. Die erfindungsgemäß verwendeten Bahnen haben eine Porengröße im Bereich von etwa 0,2 bis etwa 15 Mikrometern und sind befeuchtet, so daß der kristalline Hydroxylapatit hydratisiert ist. Die Bahnen werden auch mit einem pH-Puffer equilibriert, dessen pH im Bereich von etwa 5,5 bis etwa 10 und dessen Phosphatkonzentration im Bereich von etwa 0,001 bis etwa 0,45 M liegt.

Fig. 3 zeigt eine auseinander gezogene perspektivische Ansicht aller Teile einer Ausführungsform eines erfindungsgemäßen chromatographischen Einsatzapparates. Die Einlaßdüse 1 ist mit einem Strömungsverteiler 5 verbunden. Die ringförmige Volumenausgleichsfritte 30 ist koaxial innerhalb des ringförmigen Behälters 3 angeordnet gezeigt. Die Einlaßdüse verbindet zu einem Ende des Behälters 3, während die Auslaßdüse 2 mit dem entgegengesetzten Ende des ringförmigen Behälters 3 in Verbindung steht. Die ringförmige Volumenausgleichsfritte 30, die aus extra Windungen einer porösen, spiralgewickelten Bahn in der bevorzugten Ausführungsform besteht, ist koaxial innerhalb des ringförmigen Behälters angeordnet gezeigt. Die spiralgewickelte oder um einen Kern gewickelte Bahn 60 ist innerhalb der ringförmigen Volumenausgleichsfritte 30 angeordnet. Die ringförmige Volumenausgleichsfritte 30 kann durch eine dünne Schicht von starrem Polypropylen ersetzt sein. Fig. 3 zeigt ferner die poröse zentrale Stütze 40, Einlaßdichtung 10 und Auslaßdichtung 15. Die Dichtungen 10 und 15 können aus einem inerten, nicht porösen Material, z.B. Polyethylen oder Naturkautschuk, hergestellt sein.

Fig. 4 zeigt eine vergrößerte Querschnittsansicht entlang der Linie 4-4 von Fig. 1. Diese Ansicht zeigt den Stromverteiler 5 und die Einlaßdichtung 10. Der Verteiler 5 und die nicht gezeigte Einlaßdüse sind an die Einlaßdichtung 10 geklebt oder anders verbunden.

Die Einlaß- und Auslaßdüsen, der ringförmige Behälter und die Luer-Verschlüsse können aus jedem Material hergestellt sein, das bezüglich der Probenlösungen und der Elutionslösungen inert ist bei den am Chromatographiesäuleneinsatz angewandten Drücken und Temperaturen. Ein bevorzugtes Material ist ein Kunststoffmaterial, wie z. B. Polyethylen, Polypropylen oder Polycarbonat.

Die in Fig. 5 dargestellte Ansicht zeigt einige der Bestandteile des Chromatographieeinsatzes einer zweiten Ausführungsform in zusammengebautem Zustand. Die Höhe des Druckes wird im wesentlichen kleiner als etwa 1,72 bar (25 psi) sein, um einen Einsatz mit konstanter Kapazität bei der zweiten bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform zu erhalten. Der zusammengebaute Chromatographieeinsatz 125 weist eine Einlaßdüse 101, eine Auslaßdüse 102, einen ringförmigen Behälter 103, einen Stromverteiler 104 und einen Stromsammelr 105 auf. Die in Fig. 5 gezeigte Ausführungsform des zusammengebauten Chromatographieeinsatz-

zes umfaßt auch eine einzelne oder geschichtete poröse, im wesentlichen nicht quellbare Bahn 106, die hydratisierte, kristalline Hydroxylapatitteilchen 107, die in ihr dauerhaft eingelagert sind, enthält.

Fig. 6 zeigt eine auseinander gezogene perspektivische Ansicht aller Teile der zweiten Ausführungsform. Die einzelne oder geschichtete poröse, im wesentlichen nicht quellbare Bahn ist zwischen dem oberen Teil des ringförmigen Behälters 126 und dem unteren Teil des ringförmigen Behälters 127 angeordnet.

Fig. 7 ist eine Ansicht, die die auf den Oberflächen des Stromverteilers 104 und des Stromsammlers 105 gefundenen Strömungskanäle zeigt.

Bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens schließt ein bevorzugtes Verfahren zur Trennung komplexer Proteine aus einer Probe folgende Schritte ein:

- a) in einer chromatographischen Vorrichtung wird in Anwesenheit eines pH-Puffers eine Flüssigkeit, die komplexe Proteine enthält, mit einem chromatographischen Medium zusammengebracht, das hydratisierte, kristalline Hydroxylapatitteilchen enthält, die einen anfänglichen zum Binden von komplexen Proteinen verfügbaren Oberflächenbereich haben, wobei die Teilchen dauerhaft in einer im wesentlichen nicht quellbaren, porösen Bahn immobilisiert sind, die Bahn die hydratisierten, kristallinen Hydroxylapatitteilchen in Wechselwirkung mit der Flüssigkeit treten läßt, so daß die Kombination von Oberflächenbereich mit gebundenem komplexem Protein und von ungebundenem Oberflächenbereich im wesentlichen gleich dem anfänglichen Oberflächenbereich ist, wodurch sich eine Vielzahl von komplexen Protein/Hydroxylapatitteilchen-Komplexen bildet, und
- b) die komplexen Proteine von den komplexen Protein/Hydroxylapatitteilchen-Komplexen dissoziiert werden durch Zusammenbringen der Komplexe mit wenigstens einer Eluierungslösung, die mit etwa derselben Rate durch das chromatographische Medium vom Beginn bis zum Ende der Dissoziation fließt.

Wie er hier verwendet wird, soll der Begriff "im wesentlichen gleich dem", wenn er sich auf den anfänglichen Oberflächenbereich der HA Teilchen bezieht, heißen, daß der entstandene HA Abrieb vernachlässigbar ist. Vorzugsweise wird die im wesentlichen nicht quellbare, poröse Bahn aus der aus Polytetrafluorethylen und Glasfaserpapier bestehenden Gruppe ausgewählt und hat ein Format, das aus der aus spiralgewickelten, um einen Kern gewickelten, gefalteten und geschichteten Bahnen bestehenden Gruppe ausgewählt ist; der Puffer hat einen pH im Bereich von etwa 5,5 bis etwa 10 und eine Phosphatkonzentration im Bereich von etwa 0,001 bis etwa 0,10 M; und die die Proteine enthaltende Probe enthält wenigstens eine Antikörperklasse, vorzugsweise monoklonal. Fachleute werden erkennen, daß "um einen Kern gewickelt" konzentrische Kreise des Bahnmaterials einschließt.

In diesem Verfahren umfassen die hydratisierten, kristallinen Hydroxylapatitteilchen vorzugsweise wenigstens etwa 40 Gewichtsprozent des chromatographischen Mediums und haben eine Teilchengrößeverteilung im Bereich von etwa 15 bis etwa 60 Mikrometern. Besonders bevorzugt ist der Fall, in dem die hydratisierten, kristallinen Hydroxylapatitteilchen wenigstens et-

wa 75 Gewichtsprozent des chromatographischen Mediums umfassen und eine Teilchengrößeverteilung im Bereich von etwa 15 bis etwa 60 Mikrometern haben.

Die Eluierungslösung umfaßt einen Phosphatgradienten mit ansteigender Phosphatkonzentration mit vorzugsweise einer Endkonzentration von wenigstens etwa 0,14 M, bevorzugter von wenigstens etwa 0,45 M.

Wie er hier verwendet wird, bedeutet der Begriff "anfänglichen zum Binden .... verfügbaren Oberflächenbereich" den Oberflächenbereich, der annähernd notwendig ist, um die Trennung zu bewirken, von dem angenommen wird, daß er Fachleuten bekannt ist, typische Zusammensetzungen der Bahn werden in den Beispielen gezeigt.

Außerdem bedeutet der Begriff "etwa derselben Rate", wenn er sich auf die Fließrate bezieht, daß die Fließrate während der Trennung vernachlässigbar abnimmt mit entsprechend kleiner Änderung im Druck. Der Begriff "im wesentlichen keine Änderung im Druckabfall" hat eine ähnliche Bedeutung, wenn er hier verwendet wird.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung näher.

#### Beispiel

Ein Chromatographieeinsatz, der 80 cm<sup>2</sup> Polytetrafluorethylenhydratisiertes, kristallines Hydroxylapatit (PTFE-HA) Verbundbahn enthielt, die 20 Gewichtsprozent PTFE und 80 Gewichtsprozent HA enthielt, wobei das HA aus 72 Gewichtsprozent Bio-Gel HTP mit DNA-Qualität und 28 Gewichtsprozent Bio-Gel HTP zusammengesetzt war, wurde gemäß Fig. 1 zusammengebaut. Der Einsatz wurde mit einem Gradienten-Flüssigkeitschromatographiesystem verbunden und bei einer Fließrate von 1,0 ml pro Minute zunächst mit 0,40 M Natriumphosphatpuffer, pH 6,8 (B), dann mit 0,01 M Natriumphosphatpuffer, pH 6,8 (A) equilibriert. Die Pumpe des Chromatographiesystems wurde gestoppt und 250 Mikroliter einer Mischung von einfachen Proteinen, die aus jeweils 1 mg von Rinderserumalbumin, Lysozym und Pferdecytochrom C in (A) bestand, wurden in die Vorrichtung durch ein Dreiwege-Luer-Ventil unter Verwendung einer 1 ml Spritze eingebracht. Die Pumpe wurde angestellt und ein 30 Minuten konkaver Gradient von (A) nach (B) wurde zu dem Einsatz gefördert. Das Einsatzeluat wurde bei einer ultravioletten Wellenlänge von 280 Nanometer überwacht. Die drei einfachen Proteine eluierten von dem Einsatz innerhalb von 50 Minuten, wie in Fig. 8 gezeigt.

#### Beispiel 2

Ein Chromatographieeinsatz, der fünf (5) Schichten von 25 mm Kreisen (24,5 cm<sup>2</sup>) von Polytetrafluorethylenhydratisiertes, kristallines Hydroxylapatit (PTFE-HA) Verbundbahn enthielt, die 20 Gewichtsprozent PTFE und 80 Gewichtsprozent HA enthielt, in dem das HA aus 72 Gewichtsprozent Bio-Gel HTP mit DNA Qualität und 28 Gewichtsprozent Bio-Gel HTP bestand, wurde gemäß Fig. 6 zusammengebaut. Der Einsatz wurde mit einem Gradienten-Flüssigkeitschromatographiesystem verbunden und bei einer Fließrate von 1,0 ml pro Minute zuerst mit 0,40 M Natriumphosphatpuffer, pH 6,8 (B), dann mit 0,01 M Natriumphosphatpuffer pH 6,8 (A), equilibriert. Die Pumpe des Chromatographiesystems wurde gestoppt und 250 Mikroliter einer Mischung von einfachen Proteinen, die aus 2,5 mg Rinder-

serumalbumin, 2,0 mg Hühnerlysozym und 2,2 mg Pferdecytochrom C in (A) bestand, wurden durch ein Dreiwege-Luer-Ventil unter Verwendung einer 1 ml Spritze in die Vorrichtung eingebracht. Die Pumpe wurde angestellt und ein vierstufiger Gradient angewandt. Nachdem kurz bei 0% B fortgesetzt wurde, war der erste Schritt 10% B, der zweite 21% B, der dritte 32% B und der vierte 68% B. Das Einsatzeluat wurde bei einer ultravioletten Wellenlänge von 280 Nanometer überwacht. Die drei einfachen Proteine eluierten von dem Einsatz, wie in Fig. 9 gezeigt.

#### Beispiel 3

Ein Chromatographieeinsatz der fünf (5) Schichten von 25 mm Kreisen ( $24,5 \text{ cm}^2$ ) aus Glasfaser-hydratisiertes, kristallines Hydroxylapatit (GF-HA) Verbundbahn enthielt die 50 Gewichtsprozent Glasfasern und 50 Gewichtsprozent HA enthielt, in dem das HA aus 100% Bio-Gel HTP mit DNA-Qualität bestand, wurde gemäß Fig. 6 zusammengebaut. Der Einsatz war mit einem Gradienten-Flüssigkeitschromatographiesystem verbunden und wurde bei einer Fließrate von 1,0 ml pro Minute zuerst mit 0,40 M Natriumphosphatpuffer, pH 6,8 (B), dann mit 0,01 M Natriumphosphatpuffer, pH 6,8 (A), equilibriert. Die Pumpe des Chromatographiesystems wurde abgestellt und 250 Mikroliter einer Mischung von einfachen Proteinen, die aus 2,5 mg Rinderserumalbumin, 2,0 mg Hühnerlysozym und 2,2 mg Pferdecytochrom C in (A) bestand, wurden der Vorrichtung über ein Dreiwege-Luer-Ventil unter Verwendung einer 1 ml Spritze zugeführt. Die Pumpe wurde angestellt und ein dreistufiger Gradient angewendet. Nachdem kurz bei 0% B fortgesetzt wurde, war der erste Schritt 15% B, der zweite 34% B und der dritte 68% B. Das Einsatzeluat wurde bei einer ultravioletten Wellenlänge von 280 Nanometer überwacht. Die drei einfachen Proteine eluierten aus dem Einsatz, wie in Fig. 10 gezeigt.

#### Beispiel 4

Ein Chromatographieeinsatz, der drei (3) Schichten von 47 mm Kreisen ( $47,7 \text{ cm}^2$ ) aus Polytetrafluorethylenhydratisiertes, kristallines Hydroxylapatit (PTFE-HA) Verbundbahn enthielt, die 20 Gewichtsprozent PTFE und 80 Gewichtsprozent HA enthielt, in dem das HA aus 72 Gewichtsprozent Bio-Gel HTP von DNA-Qualität und 28 Gewichtsprozent Bio-Gel HTP bestand, wurde gemäß Fig. 6 zusammengebaut und mit der Ausgangsleitung eines Druckmessers verbunden. Der Druckmesser war mit einer peristaltischen Pumpe verbunden und die Pumpe war mit einem Reservoir von 0,01 M Natriumphosphatpuffer, pH 6,8 verbunden. Der Auslaß des Einsatzes war mit einem kalibrierten Durchflußmesser verbunden, um die Fließrate zu überwachen. Der Druck am Kopf war annähernd 1,08 bar (15,6 psi) bei 3 ml pro Minute ohne Nachweis von Abriebbildung, wie sie sich durch einen Anstieg des Druckes am Kopf oder eine Abnahme der Fließrate gezeigt hätte.

#### Beispiel 5

Der Chromatographieeinsatz in Beispiel 4 wurde mit der Ausgangsleitung eines Druckmessers verbunden. Der Druckmesser wurde mit einer peristaltischen Pumpe verbunden, und die Pumpe wurde mit einem Reservoir von 8 M Harnstoff, 0,01 M Natriumphosphatpuffer, pH 6,8, verbunden. Der Auslaß des Einsatzes wurde mit

einem kalibrierten Durchflußmesser verbunden, um die Fließrate zu überwachen. Der Druck am Kopf betrug annähernd 1,52 bar (22,1 psi) bei 3 ml pro Minute mit einer ähnlichen Leistung bezüglich Druck und Fluß wie in Beispiel 4.

#### Beispiel 6

Ein Chromatographieeinsatz, der drei (3) Schichten von 47 mm Kreisen ( $47,7 \text{ cm}^2$ ) aus Glasfaser-hydratisiertes kristallines Hydroxylapatit (GF-HA) Verbundbahn enthielt, die 50 Gewichtsprozent GF und 50 Gewichtsprozent HA enthielt, in dem das HA aus 100 Gewichtsprozent Bio-Gel HTP von DNA-Qualität bestand, wurde gemäß Fig. 6 zusammengebaut und mit der Ausgangsleitung eines Druckmessers verbunden. Der Druckmesser war mit einer peristaltischen Pumpe verbunden, und die Pumpe war mit einem Reservoir von 0,01 M Natriumphosphatpuffer, pH 6,8, verbunden. Der Auslaß des Einsatzes war mit einem kalibrierten Durchflußmesser verbunden, um die Fließrate zu überwachen. Der Druck am Kopf betrug annähernd 0,34 bar (5 psi) bei 3 ml pro Minute ohne wesentliche Änderung der Fließrate oder des Druckes am Kopf.

#### Beispiel 7

Der Chromatographieeinsatz in Beispiel 6 wurde mit der Ausgangsleitung eines Druckmessers verbunden. Der Druckmesser war mit einer peristaltischen Pumpe verbunden, und die Pumpe war mit einem Reservoir von 8 M Harnstoff, 0,01 M Natriumphosphatpuffer, pH 6,8, verbunden. Der Auslaß des Einsatzes war mit einem kalibrierten Durchflußmesser verbunden, um die Fließrate zu überwachen. Der Druck am Kopf betrug annähernd 0,34 bar (5 psi) bei 3 ml pro Minute wiederum ohne wesentliche Änderung des Druckes am Kopf oder der Fließrate.

Die vorstehende Beschreibung wurde hauptsächlich zur Erläuterung gegeben. Es ist für den Fachmann leicht zu sehen, daß weitere Modifikationen, Abänderungen und ähnliches bei den Materialien, Gestaltungen, Anordnungen und Formen der verschiedenen Elemente der Struktur der Chromatographiesäule ohne Abweichung von Idee und Umfang der Erfindung möglich sind. Zum Beispiel kann ein quadratischer oder rechteckiger Einsatz beim erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden. Andere pH-Puffer, wie z. B. Puffer auf Basis von Sulfat oder Carbonat, können für bestimmte Anwendungen entwickelt werden.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Trennung komplexer Proteine von einer Probe, bei dem

a) in einer chromatographischen Vorrichtung in Anwesenheit eines pH-Puffers eine Flüssigkeit, die komplexe Proteine enthält, mit einem chromatographischen Medium zusammengebracht wird, das hydratisierte, kristalline Hydroxylapatitteilchen enthält, die einen anfänglichen zum Binden von komplexen Proteinen verfügbaren Oberflächenbereich haben, wobei die Teilchen dauerhaft in einer im wesentlichen nicht quellbaren, porösen Bahn immobilisiert sind, die Bahn die hydratisierten, kristallinen Hydroxylapatitteilchen in Wechselwirkung mit der Flüssigkeit treten läßt, so daß die

Kombination vom Oberflächenbereich mit gebundenem komplexem Protein und von ungebundenem Oberflächenbereich im wesentlichen gleich dem anfänglichen Oberflächenbereich ist, wodurch sich eine Vielzahl von komplexen Protein/Hydroxylapatitteilchen-Komplexen bildet, und

b) die komplexen Proteine von den komplexen Protein/Hydroxylapatitteilchen-Komplexen dissoziiert werden durch Zusammenbringen der Komplexe mit wenigstens einer Eluierungslösung, die mit etwa derselben Rate durch das chromatographische Medium vom Beginn bis zum Ende der Dissoziation fließt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die im wesentlichen nicht quellbare, poröse Bahn aus der aus Polytetrafluorethylen und Glasfaserpapier bestehenden Gruppe ausgewählt ist, der pH-Puffer eines pH im Bereich von etwa 5,5 bis etwa 10 und eine Phosphatkonzentration im Bereich von etwa 0,001 bis etwa 0,10 M hat, und die Proteine wenigstens eine Antikörperklasse enthalten.

3. Verfahren nach Anspruch 2, bei dem wenigstens eine Antikörperklasse aus monoklonalen Antikörpern besteht.

4. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die hydratisierten, kristallinen Hydroxylapatitteilchen wenigstens etwa 40 Gewichtsprozent des chromatographischen Mediums umfassen und eine Teilchengrößeverteilung im Bereich von etwa 15 bis etwa 60 Mikrometern haben.

5. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem wenigstens eine Eluierungslösung einen Phosphatgradienten mit einer Endkonzentration von wenigstens etwa 0,14 M umfaßt.

6. Chromatographischer Apparat zur Reinigung von Antikörpern mit:

einer Einlaßdüse,

einem Stromverteiler zur Aufnahme des Flusses von der Einlaßdüse,

einer Einlaßdichtung,

einem spiralgewickelten oder um einen Kern gewickelten chromatographischen Trennmittel, das ringförmig ist und eine innere und eine äußere zylindrische Oberfläche aufweist und das hydratisierte, kristalline Hydroxylapatitteilchen enthält, die physikalisch in einer porösen, im wesentlichen nicht quellbaren Bahn eingeschlossen sind, wobei die Teilchen einen anfänglichen zum Binden von monoklonalen Antikörpern verfügbaren Oberflächenbereich haben, und die Bahn die Teilchen daran hindert, während der Reinigung ihre räumliche Lage innerhalb des spiralgewickelten oder um einen Kern gewickelten chromatographischen Trennmittels wesentlich zu ändern,

einer porösen zentralen Stütze, um das das spiralgewickelte oder um einen Kern gewickelte chromatographische Trennmittel gewickelt ist,

einer Auslaßdichtung,

einer Auslaßdüse und

einem ringförmigen Behälter zur axialen Verbindung von Einlaß- und Auslaßdüse, der eine innere ringförmige Oberfläche hat, die nicht in Kontakt mit der äußeren zylindrischen Oberfläche des spiralgewickelten oder um einen Kern gewickelten chromatographischen Trennmittels steht, und der den Stromverteiler, die Einlaß- und Auslaßdichtungen, die poröse, zentrale Stütze und das chromato-

graphische Trennmittel enthält.

7. Apparat nach Anspruch 6, bei dem die poröse, im wesentlichen nicht quellbare Bahn Polytetrafluorethylen ist.

8. Apparat nach Anspruch 7, bei dem die zentrale Stütze poröses Polypropylen ist.

9. Apparat nach Anspruch 6, bei dem die hydratisierten, kristallinen Hydroxylapatitteilchen wenigstens etwa 40 Gewichtsprozent des chromatographischen Mediums umfassen und eine Teilchengrößeverteilung im Bereich von etwa 15 bis etwa 60 Mikrometern haben.

10. Apparat nach Anspruch 6, bei dem die hydratisierten, kristallinen Hydroxylapatitteilchen wenigstens etwa 75 Gewichtsprozent des chromatographischen Mediums umfassen und eine Teilchengrößeverteilung im Bereich von etwa 15 bis etwa 60 Mikrometern haben.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen



— Leerseite —

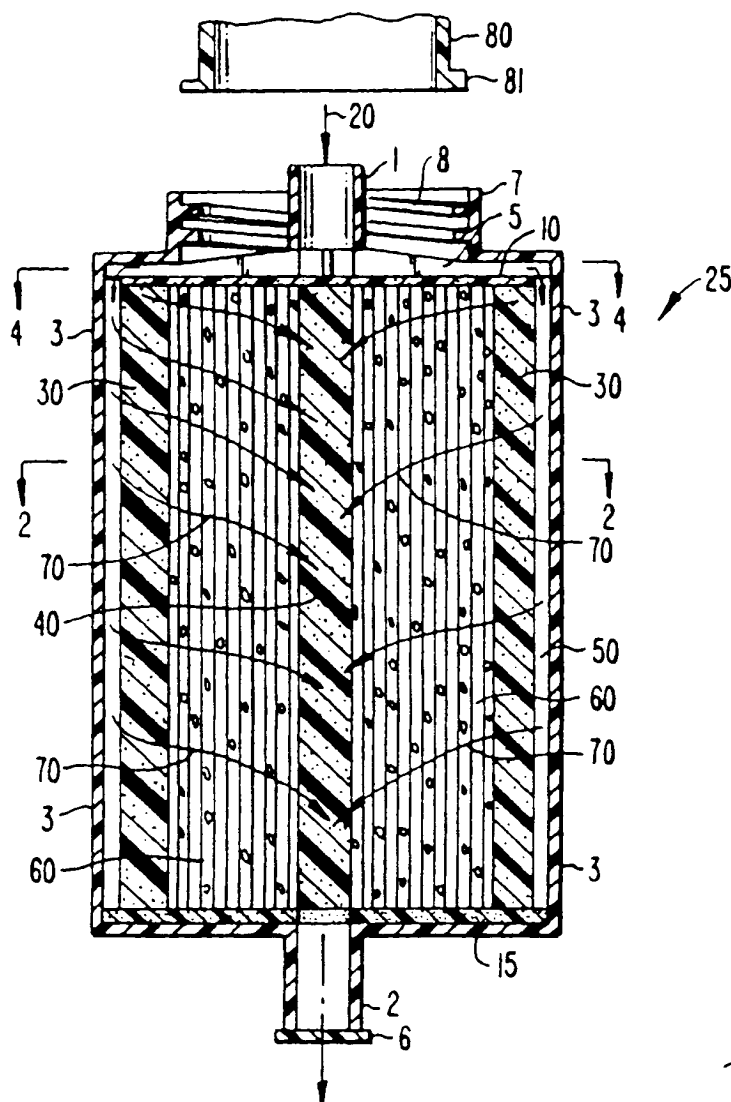


FIG. 1.

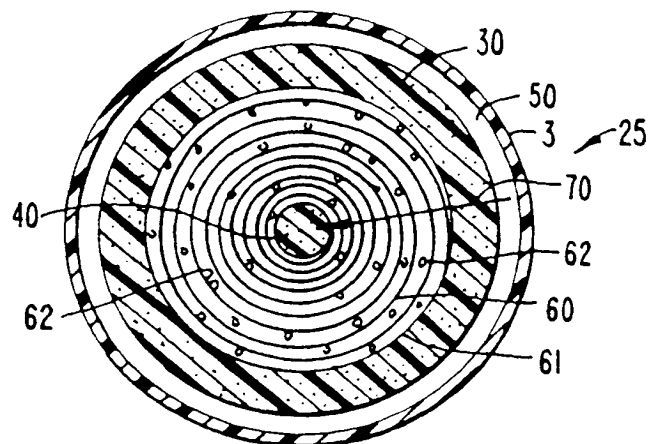
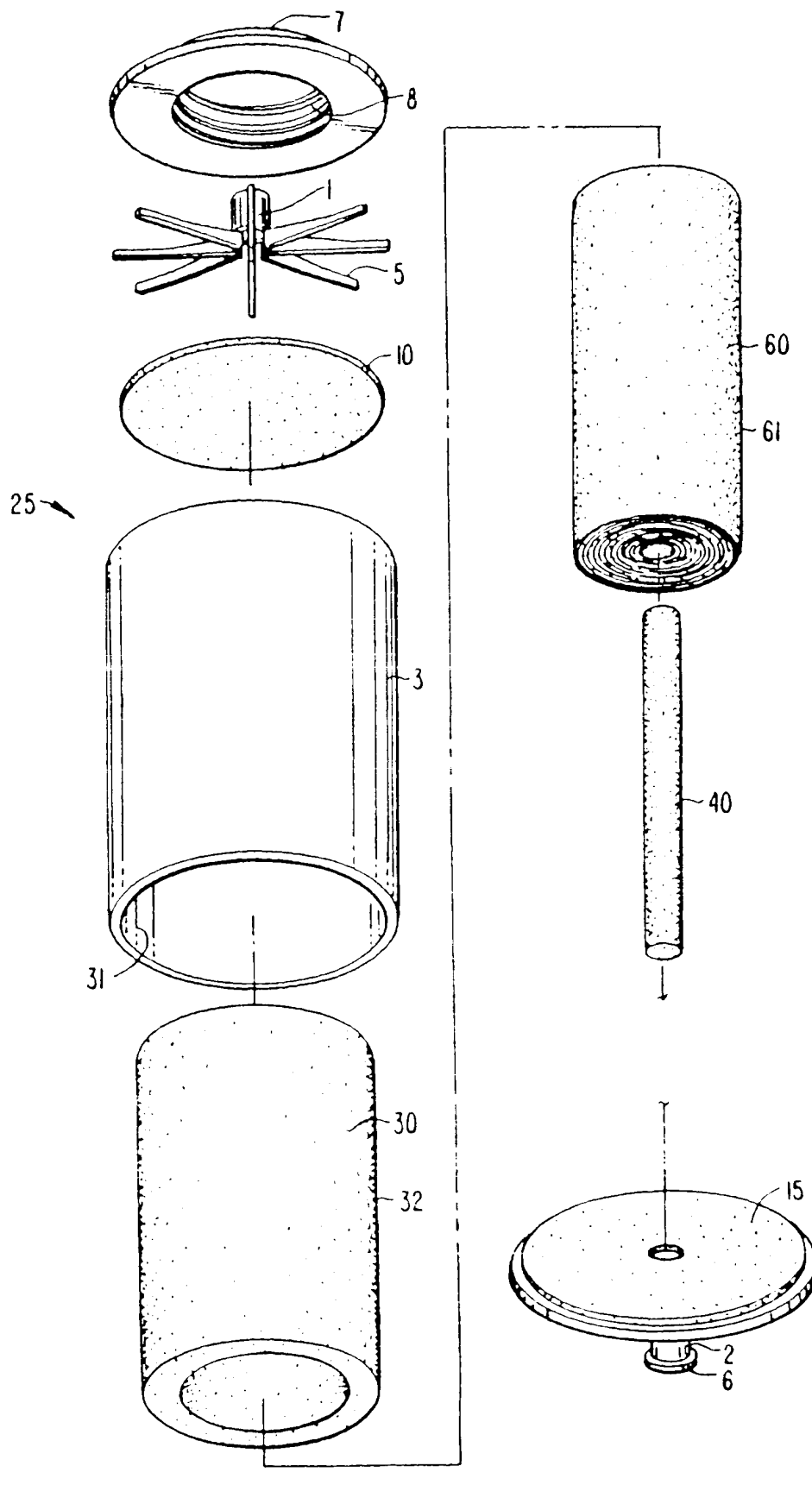


FIG. 2.

FIG. 3.



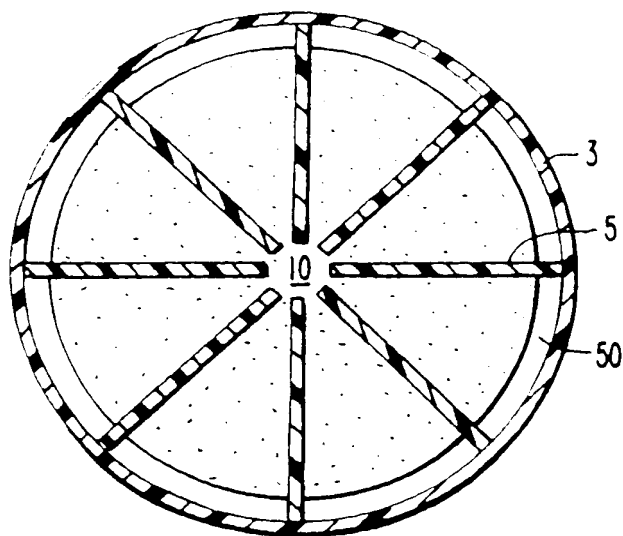


FIG. 4.

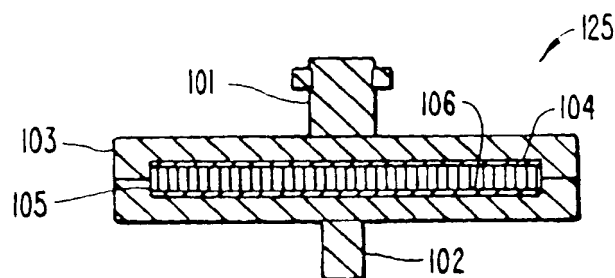


FIG. 5.

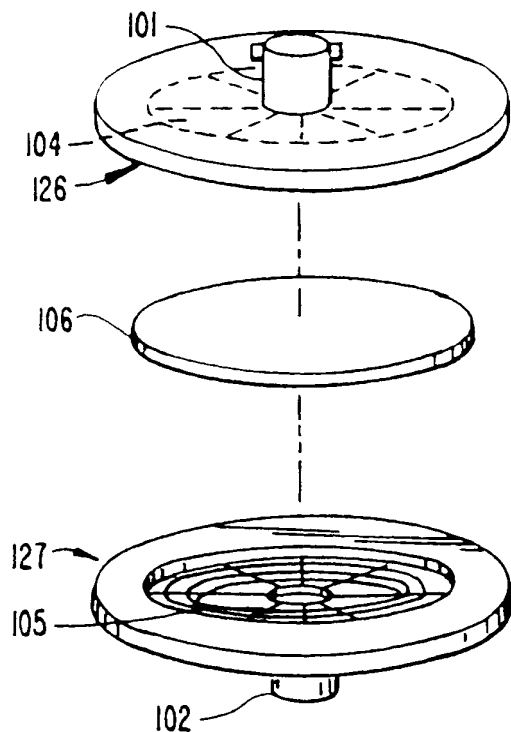


FIG. 6.

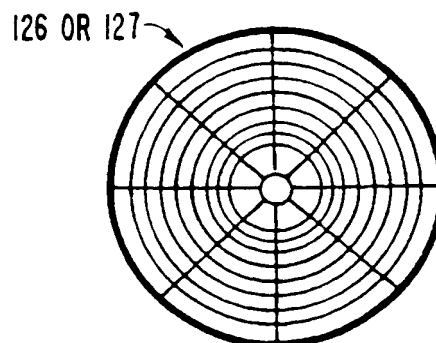


FIG. 7.

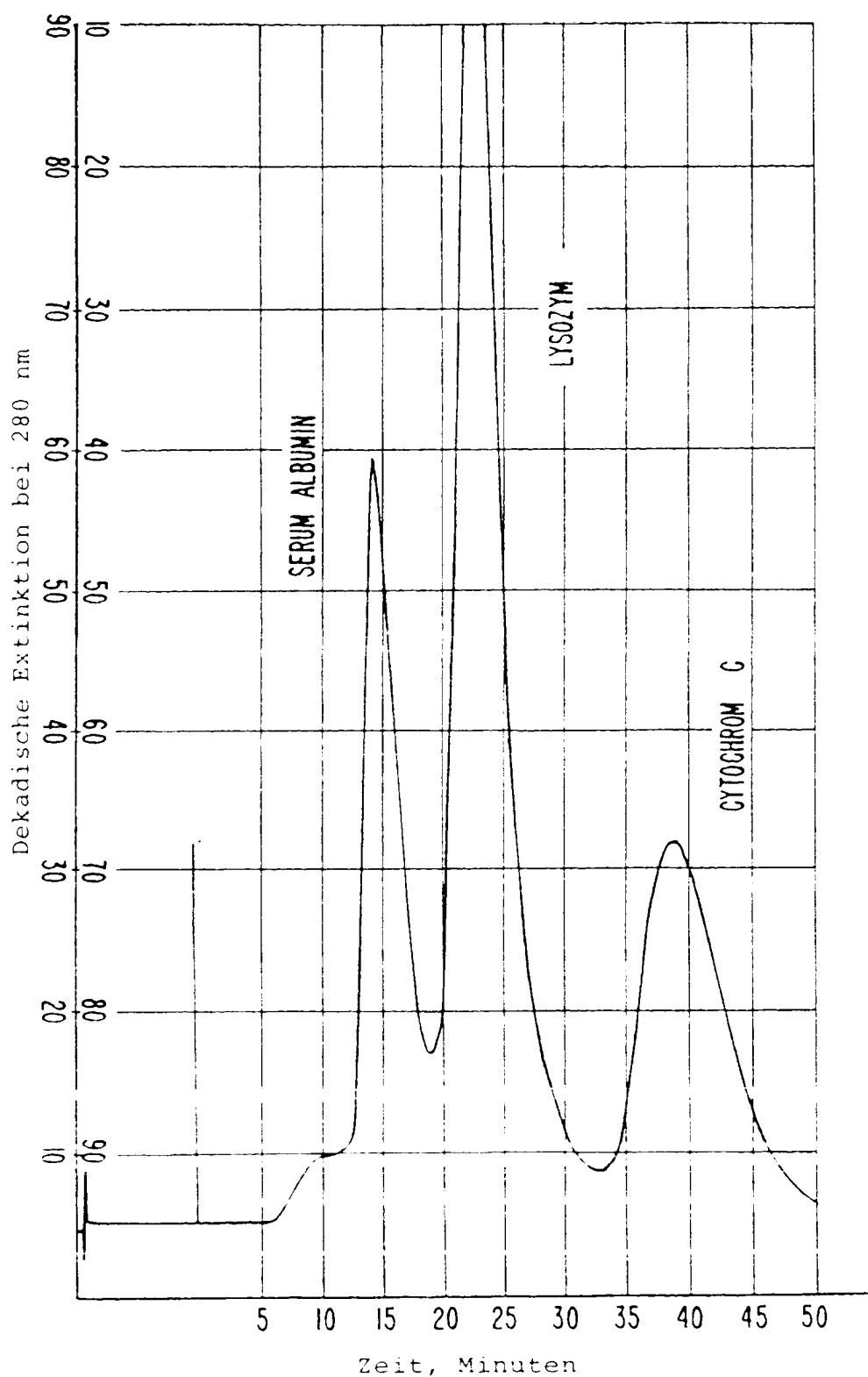


FIG. 8.

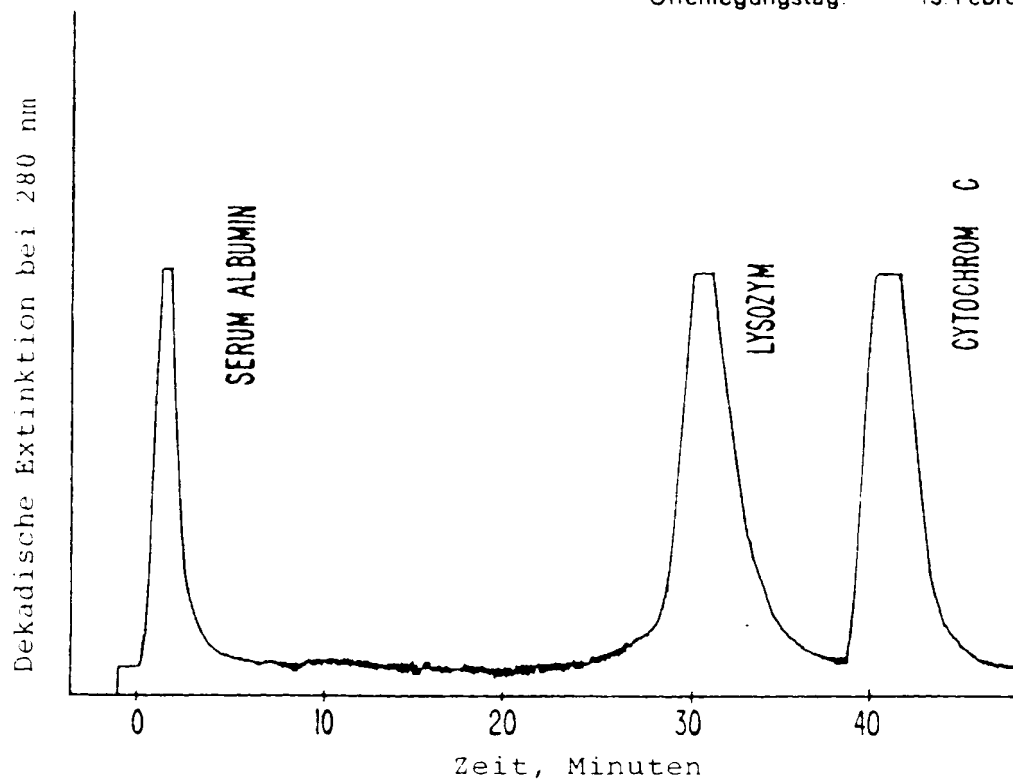


FIG. 9.

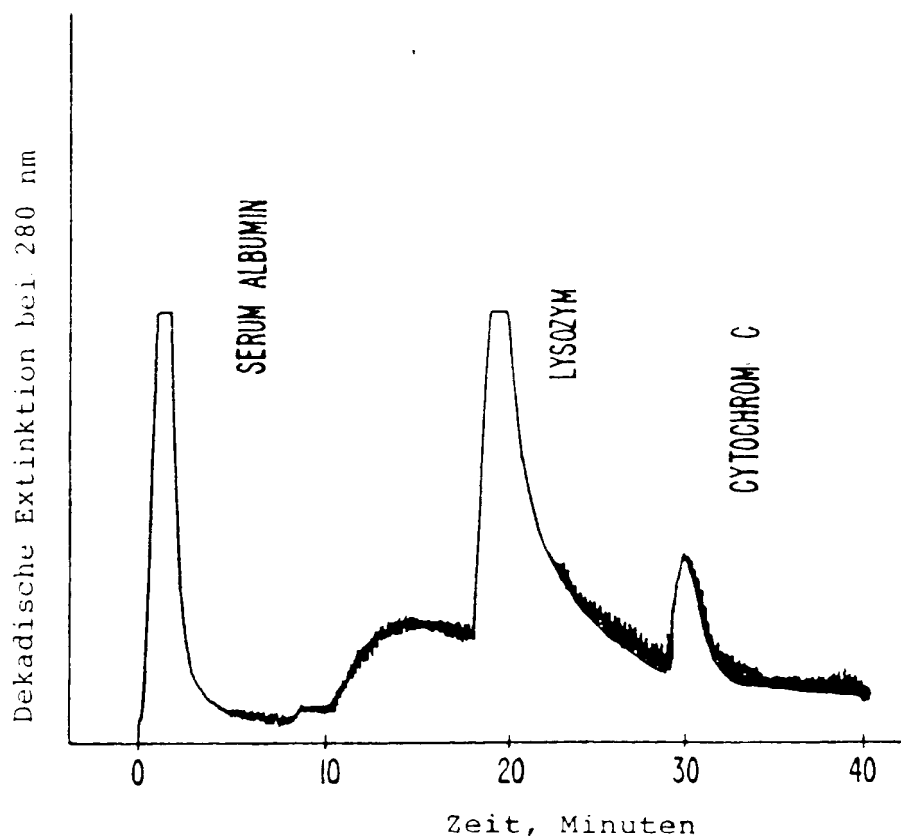


FIG. 10.